

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER
PARAOXONASEAKTIVITÄT IM SERUM
SECHS VERSCHIEDENER TIERARTEN:
KANINCHEN, RIND, SCHWEIN,
SCHAF, PFERD, HUHN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Waltraud Hörl
aus Rom/Italien

1903



Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER
PARAOXONASEAKTIVITÄT IM SERUM
SECHS VERSCHIEDENER TIERARTEN:
KANINCHEN, RIND, SCHWEIN,
SCHAF, PFERD, HUHN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Waltraud Hörl
aus Rom/Italien

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. F. Wolf

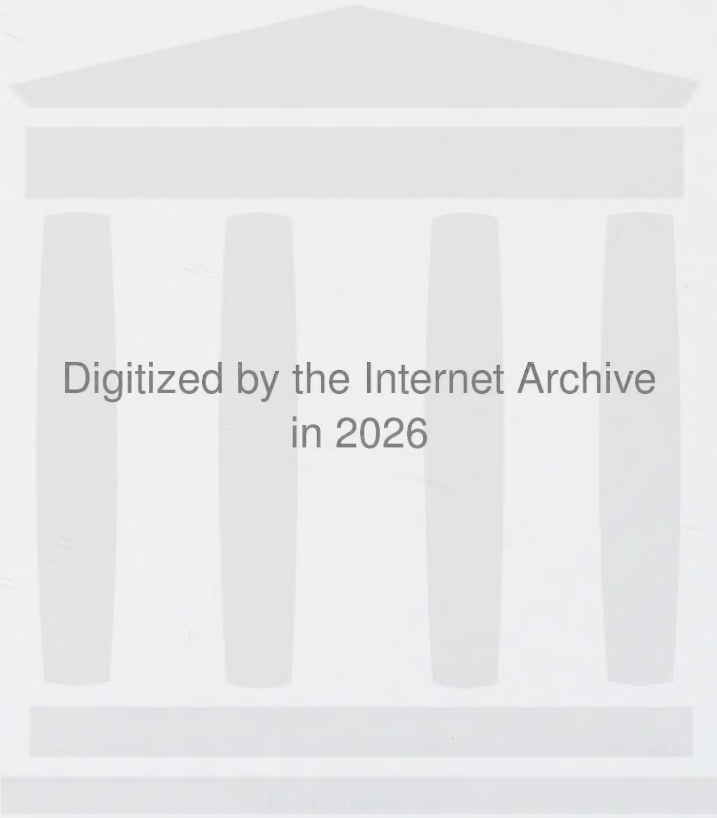
Referent: Prof. Dr.Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt

Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.1983

In Dankbarkeit

meinen lieben Eltern gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546206_0116

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	<u>Einleitung</u>	
	Entdeckung und Erforschung der Paraoxonase Ein chronologisch geordneter Überblick	1
2.	<u>Physiologie des Nervensystems</u>	6
	<u>Klinik der Vergiftungen mit organischen Phosphorsäureestern</u>	
2.1.	Physiologie des Nervensystems	6
2.1.1.	Wirkungsweise von Acetylcholin und Cholin- esterase im Organismus	7
2.1.2.	Hemmstoffe der Cholinesterase	12
2.2.	Parathion und Paraoxon, wichtige Ver- treter organischer Phosphorsäureester	13
2.2.1.	Eigenschaften von Parathion und Paraoxon	14
2.2.2.	Metabolismus von Parathion im mensch- lichen Organismus	16
2.3.	Klinik der Vergiftungen mit organischen Phosphorsäureestern	19
2.3.1.	Vergiftungsmöglichkeiten	19
2.3.2.	Vergiftungssymptome	19
2.3.3.	Therapie	23
3.	<u>Problemstellung</u>	25
4.	<u>Experimentelle Untersuchungen</u>	26
4.1.	Methodik und Untersuchungsmaterialien	26
4.1.1.	Art der Meßmethode	26
4.1.1.1.	Standardmethode nach Krisch	26
4.1.1.2.	Modifikation der Enzymaktivitäts- bestimmung nach Krisch	28

4.1.1.2.1.	Versuchsdurchführung	28
4.1.1.2.2.	Berechnung der Aktivität	32
4.1.1.2.3.	Versuchsauswertung, dargestellt am Beispiel einer Präzisionsmessung	33
4.1.1.3.	Vergleich beider Meßmethoden	35
4.2.	Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen	37
4.2.1.	Paraoxonaseaktivität im Humanserum	38
4.2.2.	Paraoxonaseaktivität im Kaninchen- serum	39
4.2.3.	Paraoxonaseaktivität im Rinderserum	40
4.2.4.	Paraoxonaseaktivität im Schweineserum	41
4.2.5.	Paraoxonaseaktivität im Schafserum	42
4.2.6.	Paraoxonaseaktivität im Pferdeserum	43
4.2.7.	Paraoxonaseaktivität im Hühnerserum	43
4.2.8.	Paraoxonaseaktivität im Reh- und Eselserum	44
5.	<u>Diskussion</u>	45
6.	<u>Zusammenfassung</u>	49
7.	<u>Literaturverzeichnis</u>	50

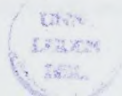
1. Einleitung

=====

Seit dem zweiten Weltkrieg werden Phosphorsäureester in zunehmendem Maße als Insektenbekämpfungsmittel eingesetzt. Sie dienen auch als Weichmacher für Kunststoffe, als Oxidationsinhibitoren für Schmieröle und als Extraktionsmittel. Heute findet sich in fast jedem Haushalt ein Phosphorsäureester enthaltendes Präparat.

Phosphorsäureesterverbindungen zählen zu den Fraß-, Atem- und Kontaktgiften. Aufgrund der weiten Verbreitung organischer Phosphorsäureesterverbindungen treten relativ häufig Vergiftungsfälle mit diesen Stoffen auf. Das klinische Bild variiert mit der Schwere der Vergiftung; letale Verlaufsformen sind bekannt. Die Genese der Vergiftungen kann akzidentieller, suizidaler oder krimineller Art sein. Im Fall Christa Lehmann aus Worms im Jahre 1954 ist dokumentiert (22), daß sie mit Parathion ihren Ehemann, ihren Schwiegervater und die Mutter ihrer Freundin umgebracht hatte. Die meisten Vergiftungsunfälle ereignen sich im landwirtschaftlichen Bereich. Ebenso wie die Bevölkerung durch den Einsatz von organischen Phosphorsäureestern bei deren Verwendung als Pflanzenschutzmittel gefährdet wird, können Nutztiere durch Kontamination mit dem Gift geschädigt werden. Nicht ohne Grund ist in der Bienenschutzverordnung vom 19.12.1972 verankert (6), daß Pflanzenschutzmittel z.B. nicht in die offene Blüte gespritzt oder gestäubt werden dürfen. Der Wirkungsmechanismus der organischen Phosphorsäureesterverbindungen im Organismus ist heute weitgehend geklärt. Dagegen ist die Suche nach einer geeigneten Behandlungsmethode lebensbedrohlich vergifteter Patienten immer noch nicht abgeschlossen.

Parathion oder E 605 ist ein Vertreter organischer Phosphorsäureesterverbindungen und selbst weitgehend ungiftig. Nach Kontamination des Organismus mit Parathion entsteht sein toxisches Oxidationsprodukt: Paraoxon oder E 600 (25, 29). Im Humanserum und im Serum einiger Tierarten gibt es ein Enzym, die Paraoxonase, die durch hydrolytische Spaltung Paraoxon in zwei ungiftige Bestandteile zerlegt. (Vgl. 2.2.2 Metabolis-



mus von Parathion im menschlichen Organismus.)

Entdeckung und Erforschung der Paraoxonase -Ein chronologisch geordneter Überblick

Im Jahre 1947 untersuchte GROB (16) den Wirkungsmechanismus organischer Phosphorsäureesterverbindungen im Organismus von Säugetieren. Seine Experimente lieferten folgendes Ergebnis: Phosphorsäureester sind starke Hemmstoffe für Cholinesterasen. Einer der bekanntesten Cholinesterasehemmer aus der Gruppe der Organophosphatverbindungen ist das Paraoxon oder E 600, das "Giftungsprodukt" des Parathions oder E 605, das 1944 von SCHRADER entdeckt wurde (29).

1953 fand ALDRIDGE (1, 2) im Serum von Ratten, Pferden und Kaninchen ein E 600-spaltendes Enzym. Durch seine Versuche kam er zu folgenden Ergebnissen: Hinsichtlich der verschiedenen Hemmbarkeit der Serumesterasen durch Paraoxon muß man zwei Esterasetypen unterscheiden: Die A-Esterase (Aromatic- oder Arylesterase), die durch E 600 nicht gehemmt wird, und die B-Esterase, die durch E 600 in einer Konzentration von 10^{-7} bis 10^{-8} mol/l hemmbar ist. ALDRIDGE wies die A-Esterase im Humanserum und in 10 verschiedenen Tierseren nach. Bei der Ente z.B. fiel der Nachweis negativ aus. Kurz darauf entdeckte ALDRIDGE ein spezifisches E 600-hydrolysierendes Enzym, das er "E 600-Esterase" nannte. Durch vergleichende Untersuchungen konnte er zeigen, daß die E 600-Esterase und die A-Esterase identisch sind. Aktivitätsschwankungen des Enzyms innerhalb einer Tierart seien -so glaubte er- auf Proteinunterschiede der Enzyme zurückzuführen.

Im selben Jahr wiesen MOUNTER und WHITTAKER (23) -unabhängig von ALDRIDGE- im menschlichen Serum ein entsprechendes Enzym nach. Sie unterscheiden fünf Phenolester-hydrolysierende Esterasen (erythrocyte-aceto-cholinesterase, erythrocyte-aromatic-esterase, erythrocytealiesterase, plasma-butyrylcholinesterase, plasma- aromatic-esterase), von denen die zweite und fünfte der oben genannten Esterasen wahrscheinlich mit der von ALDRIDGE gefundenen A-Esterase übereinstimmen dürften.

AUGUSTINSSON und HEIMBÜRGER (3, 4), die sich ebenfalls sehr intensiv mit der enzymatischen Hydrolyse organischer Phosphorsäureesterverbindungen befaßten, trennten in Cohn'schen Fraktionen aus dem Humanserum die "Phosphorylphosphatase" -die u.a. DFP und E 600 hydrolysiert (Fraktion IV-1)-, die Cholinesterase (Fraktion V-6) und andere Enzyme. Aufgrund ihrer Untersuchungen vermuteten sie, daß E 600 sowohl durch die Aldridge'sche A-Esterase, als auch durch eine Phosphorylphosphatase gespalten werde.

Fünf Jahre später (1959) beobachteten FRIEBERG und ERDMANN (10) die spontane Reaktivierung von Cholinesterasen in Pferde- und Rinderseren, die durch E 600 vergiftet worden waren. Diese Entgiftung führten sie auf eine rasche Zerstörung des dem Serum zugesetzten E 600 zurück, das vermutlich durch Phosphorylphosphatasen abgebaut wird.

1960 versucht MAIN (21), das E 600-spaltende Enzym, genannt Paraoxonase, aus Schafserum möglichst rein darzustellen. Er gewann durch 350fache Anreicherung des Enzyms ein 80 bis 95 %ig reines Enzympräparat. Das Molekulargewicht ermittelte er zu 35.000 bis 50.000.

Zum selben Zeitpunkt (1960) experimentierten SCHAUMANN und SCHILLER (28) mit Seren weißer Mäuse. Sie führten die Inaktivierung der Cholinesterasehemmer auf zwei voneinander unabhängige Vorgänge zurück: erstens auf eine Absorption des Hemmers an das Serum und zweitens auf dessen fermentativen Abbau.

ERDÖS und BOGGS (9) fanden 1961 in der menschlichen Serumfraktion IV-1 und in der Albuminfraktion V Paraoxon-spaltende Enzyme. Sie zeigten, daß die Paraoxon-hydrolysierende Aktivität der Fraktion IV-1 durch Äthylendiamintetraacetat (EDTA) vollständig gehemmt werden kann, daß aber hierbei die Gesamtaktivität des Nativserums nicht erfaßt war. Bei der Suche nach einer EDTA-resistenten Aktivität entdeckten sie in der Humanalbuminfraktion ein E 600 spezifisches Enzym, das durch Aluminon inaktiviert werden kann.

1967 stellten NEAL (25), NAKATSUGAWA und DAHM (24) den Giftungsmechanismus von Parathion zu Paraoxon in der Leber von Ratten mit P^{32} -markierten Präparaten fest.

SKRINJARIK-SPOLIAR und REINER (30) bestätigten 1968 die bisherigen Untersuchungen. Sie vermuteten, daß für die Hydrolyse von Paraoxon im menschlichen Serum mehrere Enzyme verantwortlich seien.

Mit der spektrophotometrischen Aktivitätsbestimmung der Paraoxonase (siehe 4.1.1.1) entdeckte KRISCH (20) 1968, daß E 600 in einer Konzentration von 10^{-4} Mol durch menschliches Serum fermentativ gespalten wird. Versuche mit jeweils 25 männlichen und weiblichen Seren ergaben eine Paraoxonaseaktivität von 38 - 190 Mol Nitrophenol pro Minute und Liter Serum. Es konnten zwei sich überlappende Gruppen unterschieden werden. Veränderungen in der Enzymaktivität unter pathologischen Bedingungen und bei Stoffwechselkrankheiten (z.B. beim Diabetes mellitus, Leukämie, Anämie, Urämie, Plasmocytom, Herzinfarkt . . .) ergaben sich nicht. KRISCH glaubt, daß die verschiedenen Aktivitäten genetisch fixiert seien.

GELDMACHER- von MALLINCKRODT, RABAST und LINDORF (12) stellten Unterschiede in der Vergiftbarkeit menschlicher Serumcholinesterasen durch E 600 fest. Die gefundenen, hierfür verantwortlichen Paraoxonaseaktivitäten konnten ihrer Höhe nach in drei Gruppen unterteilt werden: in eine Gruppe mit niedriger Aktivität (51 %), in eine Gruppe mit mittlerer Aktivität (29 %) und eine Gruppe mit hoher Aktivität (20 %). Man vermutete hier einen genetisch fixierten Polymorphismus der E 600-spaltenden Paraoxonase.

ZÜRCHER (37) hat 1971 diesen Polymorphismus bei der Untersuchung eines Kollektivs von 619 menschlichen Serumproben beweisen können.

1972 ermittelten GELDMACHER- von MALLINCKRODT, BAUMGARTNER, PETENYI, BURGIS, LINDORF und METZNER (13) bei 50 Versuchspersonen eine hochsigni-

fikante Korrelation (Korrelationskoeffizient $r = + 0,82$) zwischen dem fermentativen Abbau von E 600 und der Vergiftung der Serumcholinesterase im Humanserum.

Ergebnisse, die einer großen Versuchsreihe zur Paraoxonaseaktivitätsbestimmung zugrunde liegen und nach einer Methode von KRISCH durchgeführt wurden, lieferten den Beweis, daß die Paraoxonaseaktivität genetisch determiniert ist, und die Vererbung einem 2-Allele-Modell folgt (12).

Seit Anfang der siebziger Jahre herrscht die Vorstellung über ein 2-Allele-Modell (13, 14), das die unterschiedlichen Aktivitätshöhen bei den Paraoxonasebestimmungen erklärt.

Dieses Ergebnis wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt immer wieder bestätigt.

2. Physiologie des Nervensystems

Klinik der Vergiftungen mit organischen Phosphorsäureestern

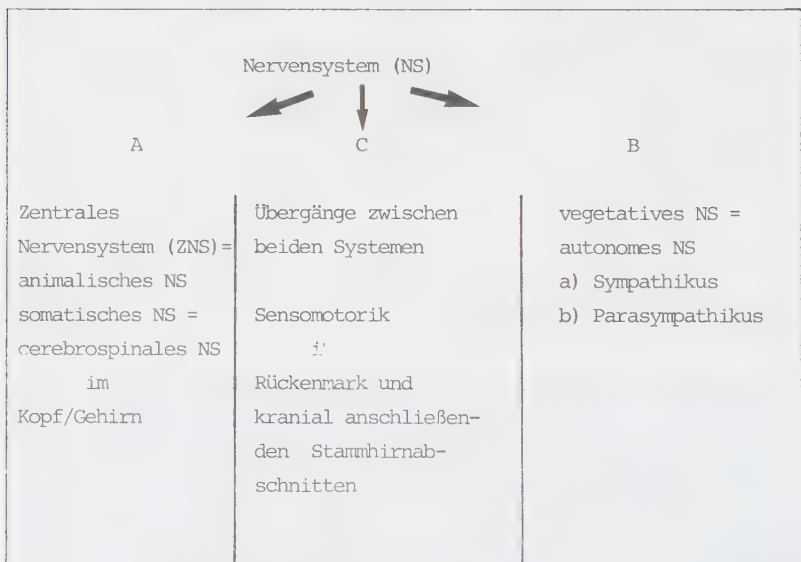
Vergiftungen mit dem Insektizid Parathion kommen seit Christa Lehmann häufiger vor und enden zum Teil tödlich.

Als erstes sollen deshalb die physiologischen Gegebenheiten des Organismus näher beleuchtet werden, die u.a. Antwort auf die Fragen nach dem Angriffspunkt des Giftes geben können, nach den resultierenden Folgen für den Organismus nach Kontamination mit dem Gift und nach eventuell bestehenden Abwehr- bzw. Eliminationsmöglichkeiten durch den Körper. 🍌

2.1 Physiologie des Nervensystems, an dem organische Phosphorsäureester angreifen (18)

In der folgenden Übersicht (Abb. 1) ist der Aufbau des Nervensystems dargestellt.

Abb. 1: Aufbau des Nervensystems



Das Nervensystem gliedert sich in drei Teile:

Auf der einen Seite steht das zentrale Nervensystem (ZNS oder animalisches NS oder somatisches NS oder cerebrospinales NS genannt), auf der anderen Seite das vegetative oder autonome NS, das sich in Sympathikus und Parasympathikus gliedert.

Beide Systeme stehen über die sogenannte Sensomotorik, die im Rückenmark und in kranial daran anschließenden Stammhirnabschnitten lokalisiert ist,

miteinander in Verbindung.

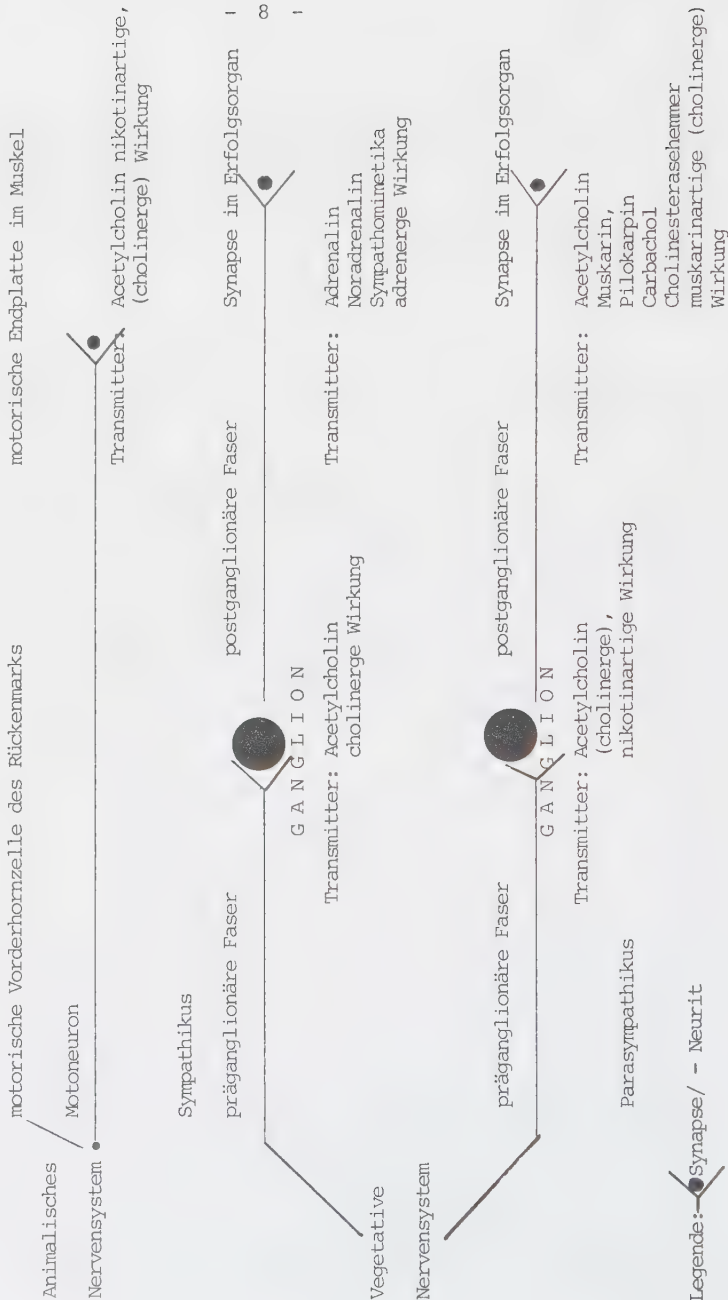
Ihre toxische Wirkung entfalten Organophosphorsäureesterverbindungen im vegetativen und zentralen Nervensystem, wie die Vergiftungssymptomatik, die in 2.3.2 beschrieben ist, durch entsprechende klinische Erscheinungsformen bestätigen wird.

2.1.1 Wirkungsweise von Acetylcholin und Cholinesterase im Organismus (18, 32)

Acetylcholin wirkt als Transmittersubstanz im vegetativen Nervensystem an präganglionären, sympathischen und prä- und postganglionären parasymphischen Synapsen, im Willkürsystem des Nervensystems an den motorischen Endplatten der quergestreiften Muskulatur. Synapsen sind die Umschaltstellen von einem Neuron auf das nächst folgende.

Einen schematischen Überblick über die Transmittersubstanzen an den verschiedenen Synapsen gibt Abb. 2 auf der nächsten Seite.

Abb. 2: Schematische Darstellung der Erregungsübertragung an den prä- und postganglionären Synapsen des Sympathikus, des Parasympathikus sowie an den somatischen Motoneuronen der quergestreiften Muskulatur



Im parasympathischen Nervensystem entfaltet Acetylcholin je nach Angriffsort zwei verschiedene Wirkungsqualitäten:

1. Die nikotinartige Wirkung tritt am präganglionären, parasympathischen Neuron auf. Es handelt sich dabei um eine mimetische Wirkung, die postsynaptische Membran wird durch eine erhöhte Ionenleitfähigkeit depolarisiert. Eine nikotinartige Wirkung von Acetylcholin als Transmittersubstanz findet man auch an der motorischen Endplatte quergestreifter Muskelfasern. Zur Wirkungsweise des Nikotins sei noch folgendes bemerkt (23):
Nikotin löst in kleinen Dosen am sympathischen und parasympathischen Ganglion eine Aktivitätssteigerung aus. Da Nikotin auf das Nebennierenmark wirkt, das von seiner Funktion her zum Teil einem sympathischen Ganglion ähnelt, kommt es zu einer vermehrten Katecholamin-Ausschüttung mit entsprechender Symptomatik. In größeren Dosen ruft Nikotin stets eine Erregungsblockierung durch Dauerdepolarisation hervor.
2. Als zweite Wirkungsqualität entfaltet Acetylcholin an den postganglionären, parasympathischen Fasern direkt in den Erfolgsorganen eine muskarinartige Wirkung. Muskarin gehört seiner Wirkungsqualität nach in die Gruppe der direkten Parasympathomimetika, d.h. es besetzt die postsynaptische Membran, bildet mit den Rezeptoren Komplexe aus, so daß (ohne Beteiligung des natürlichen Transmitterstoffs Acetylcholin) die postsynaptische Membran depolarisiert wird. In derselben Weise wirken außer Muskarin noch Pilocarpin und Carbachol, die ebenfalls zu den Parasympathomimetika zählen.

Trifft in der präsynaptischen Nervenendigung eine Erregung, d.h. ein Aktionspotential ein, so wird die Erregung über die Freisetzung von Acetylcholinvesikeln aus dem präsynaptischen Neuron in den synaptischen Spalt und durch anschließende Besetzung der Rezeptoren auf der Membran der postsynaptischen Nervenendigung fortgeleitet.

Die im synaptischen Spalt verweilende Cholinesterase spaltet das an die Rezeptoren gebundene Acetylcholin enzymatisch in Cholin und Essigsäure. Die Rezeptoren der postsynaptischen Membran sind damit wieder frei, das Neuron ist repolarisiert. Die Rezeptoren sind jetzt in der Lage, erneut Transmitter zu binden und eine weitere Erregung weiterzuleiten. Der beschriebene Vorgang wird als Erregungsübertragung bezeichnet.

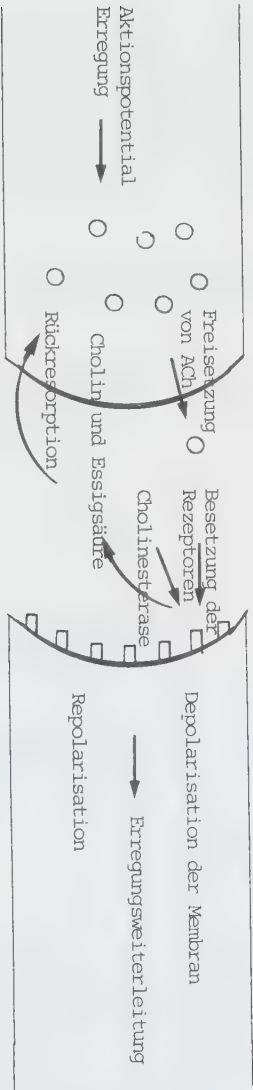
In Abb. 3 ist die Erregungsübertragung in einer Synapse von einem Neuron auf das nächst folgende schematisch dargestellt.

Abb. 3: Schematische Darstellung der Erregungsübertragung in einer Synapse

Synaptischer Spalt

Präsynaptische Nervenendigung
mit Acetylcholinvesikeln

Postsynaptische Nervenendigung
mit Acetylcholinrezeptoren



-
11
-

Acetylcholinesterase in der Synapse ist ein vor allem zellständiges Enzym, das sich normalerweise auf der postsynaptischen Membran befindet.

Legende: ○ Acetylcholinvesikel;
□ Acetylcholinrezeptor

ACH Acetylcholin

Angriffspunkt der Cholinesterasehemstoffe;
Blockade der Cholinesterase durch Bildung einer irreversiblen Bindung zwischen der Cholinesterase und dem Hemmstoff, den Organophosphaten•endogene Acetylcholininvergiftung

Durch die Wirkung der Cholinesterase ist die Gefahr einer Dauerdepolarisation der postsynaptischen Membran gebannt, die zu einer Blockade der Erregungsübertragung, zu Krämpfen und Lähmungserscheinungen führen kann. Cholinesterase spaltet Acetylcholin in Cholin und Essigsäure. Beide Spaltprodukte werden in die präsynaptische Nervenendigung rückresorbiert und zur Neusynthese von Acetylcholin wiederverwendet.

2.1.2 Hemmstoffe der Cholinesterase (17, 32)

Cholinesterasehemmstoffe gehören ihrer Wirkung nach in die Gruppe der indirekten Parasympathomimetika. Durch die Enzymhemmung wird der Acetylcholinabbau verzögert, d.h. die Acetylcholinwirkung verlängert. Klinisch zeigt sich das Bild einer endogenen Acetylcholinvergiftung.

Anticholinesterasen bzw. Enzymhemmer lassen sich folgendermaßen einteilen:

1. In Hemmstoffe, die zu einer reversiblen Hemmung der Cholinesterase führen; es herrscht ein kompetitiver Antagonismus zwischen Acetylcholin und Cholinesterasehemmer um das aktive Zentrum des Enzyms. Die Cholinesterase wird folglich blockiert, die Acetylcholinkonzentration erhöht. Wird eine bestimmte Acetylcholinkonzentration überschritten, so verdrängt das Acetylcholin seinerseits den Hemmstoff vom aktiven Zentrum des Enzyms.

Vertreter dieser Stoffgruppe sind:

Physostigmin	=	Eserin [®]
Neostigmin	=	Prostigmin [®]
Pyridostigmin	und	
Edrophonium.		

Die Wirkungsdauer dieser Stoffe liegt bei etwa 4 Stunden.

2. In Hemmstoffe, die zu einer irreversiblen Hemmung der Cholinesterase führen. Die Cholinesterase ist durch den Hemmer irreversibel durch eine Atombindung zwischen dem aktiven Zentrum der Esterase und dem Hemmer blockiert. Wie bei der reversiblen Hemmung kommt es zu einer ständig steigenden Erhöhung der AcetylcholinKonzentration in der Synapse, schließlich im Gewebe und im Blut. Die postsynaptische Membran wird dauerdepolarisiert, es resultiert eine endogene Acetylcholinvergiftung mit Atemlähmungserscheinungen und Herzrhythmusstörungen (siehe auch Vergiftungssymptomatik unter 2.3.2).

Die wichtigsten Vertreter der irreversiblen Enzymhemmer gehören in die Stoffgruppe der Alkylphosphate und der organischen Phosphorsäureesterverbindungen.

Im folgenden seien die wichtigsten Vertreter aufgeführt:

- Paraoxon oder E 600 bzw. (Parathion oder E 605)
- Fluostigmin oder Diisopropylfluorophosphat (DFP)
- Dichlorvos oder Dimethyl-2,2 dichlorvinylphosphat
- Tabun

Diese Vertreter sind zum Teil Insektizide und werden in der Schädlingsbekämpfung eingesetzt, zum Teil als Medikamente und Nervengase verwendet.

2.2 Parathion und Paraoxon - wichtige Vertreter organischer Phosphorsäureester

Organische Phosphorsäureester werden vor allem als Pflanzenschutzmittel eingesetzt. Sie diffundieren durch die unverletzte Haut, zählen also zu den Kontaktgiften, sie werden vom Magen-Darm-Trakt resorbiert, man spricht dann von Fraßgift, und sie können als Atemgift in Form von Dämpfen, Stäuben und Nebeltröpfchen inhaliert werden.

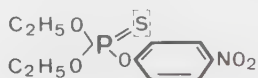
2.2.1 Eigenschaften von Parathion und Paraoxon (29)

Parathion oder E 605 wurde wie sein Oxidationsprodukt Paraoxon oder E 600 im Jahre 1944 von SCHRADER hergestellt.

Parathion hat folgende chemische Formel:



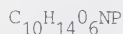
Seine Strukturformel sieht folgendermaßen aus:



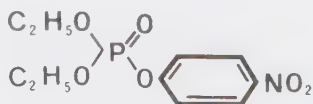
0,0-Diäthyl-0-(p-nitrophenyl)-thionophosphat

Das Molekulargewicht beträgt 291,27 g/Mol.

Paraoxon hat folgende chemische Formel:



Die Strukturformel sieht folgendermaßen aus:



0,0-Diäthyl-0-(p-nitrophenyl)-phosphat

Das Molekulargewicht beträgt 275,1 g/Mol.

1947 kam Parathion als polyvalentes, insektizides und akarizides Mittel, unter dem Namen Thiophos, durch die American Cyanamid Co/USA vertrieben, erstmals in Handel; ein Jahr später brachten die Farbenwerke Bayer Parathion unter dem Namen E 605 in Deutschland erstmals auf den Markt.

Parathion ist eine gelblich braune, schwach nach Lauch riechende Flüssigkeit, die sich in den meisten organischen Lösungsmitteln löst. In Mineralöl, Petroleum und Ligroin ist es wenig löslich; in Wasser lösen sich bei 25° C 24 mg/Liter. Parathion ist in neutraler bis saurer Lösung gegen Hydrolyse recht beständig, dagegen wird es in alkalischer Lösung sehr bald verseift.

Nach SCHRADER (29) tritt bei einer Temperatur von 80° C 50 %ige Verseifung bei einem pH kleiner als 7 nach 60 Stunden ein, bei einem pH größer als 7 nach 25 Minuten.

Parathion entwickelt im Warmblüterorganismus keine kumulativen Eigenschaften. SCHRADER (29) stellte fest, daß Hunde über längere Zeit mit Nahrung gefüttert werden konnten, der täglich etwa 1 - 3 mg Parathion zugesetzt waren, ohne daß sich irgendwelche klinischen Symptome manifestierten. Kühe wurden über einen Zeitraum von zwei Monaten täglich mit 0,33 mg Parathion/kg Körpergewicht gefüttert. Es traten keine pathologischen Verbindungen auf, die Milchproduktion blieb normal.

Reines Parathion zeigt in vitro keine Cholinesterase-Hemmwirkung, in vivo dagegen hemmt es die Cholinesterase sehr stark.

Die insektiziden Eigenschaften von Parathion kann man folgendermaßen beschreiben:

E 605 hat keine Systemwirkung, d.h. es dringt zwar gut in die Pflanzen ein, aber Überdosierungen führen im allgemeinen nicht zu phytotoxischen Symptomen. Unter Sonnenlichteinwirkung färben sich E 605-Präparate braun und werden dabei gleichzeitig in andere Moleküle zersetzt. Die Wirkung von Parathion auf einer grünen Pflanze hält 2 bis maximal 8 Tage an. Auf leblosen Unterlagen, wie z.B. Glas oder Baumrinde, wirkt Parathion viel länger. Den Unterschied erklärt man aus der Tatsache, daß in

der Pflanze Fermentsysteme vorhanden sind, die das Parathion abbauen, das auf ihren Blättern liegt. Die Wirkung von Parathion ist temperaturabhängig: bei niedrigen Temperaturen wirkt Parathion langsam, bei hohen entsprechend schneller. Vierhundert Insektenarten werden heute mit Parathion bekämpft.

Im Gegensatz zu Parathion entwickelt sein Oxidationsprodukt Paraoxon eine Systementwicklung, wenn es mit Pflanzen in Berührung kommt. Da es relativ gut wasserlöslich ist, wird es in die Pflanze aufgenommen und in den Saftströmen durch die Pflanze transportiert. E 600 ist für den Warmblüterorganismus sehr giftig. Man hat festgestellt, daß die toxische Wirkung von E 600 durch Atropin abgeschwächt werden kann. Wegen dieser hohen Toxizität wird es nicht als Pflanzenschutzmittel, sondern nur als Mottenvernichtungsmittel und in der Ophthalmologie als Miotikum eingesetzt. WIRTH (33) erkannte 1948, daß Paraoxon die Pupillen verengt und der intraokuläre Druck fällt. Deshalb wurde Paraoxon als synthetisches Antiglaukummittel in der Augenheilkunde angewendet.

Paraoxon ist in reinem Zustand farblos und eine kaumriechende, ölige Flüssigkeit. Sie läßt sich in den meisten organischen Lösungsmitteln und im Wasser bei 25 ° C zu 2,4 g/Liter lösen. Sonnenlicht wandelt E 600 in eine dunkle Flüssigkeit um, in dem es aus Paraoxon p-Nitrophenol abspaltet. E 600 ist gegen Hydrolyse in saurem Medium relativ beständig, während es im alkalischen Milieu schnell abgebaut wird.

2.2.2 Metabolismus von Parathion im menschlichen Organismus

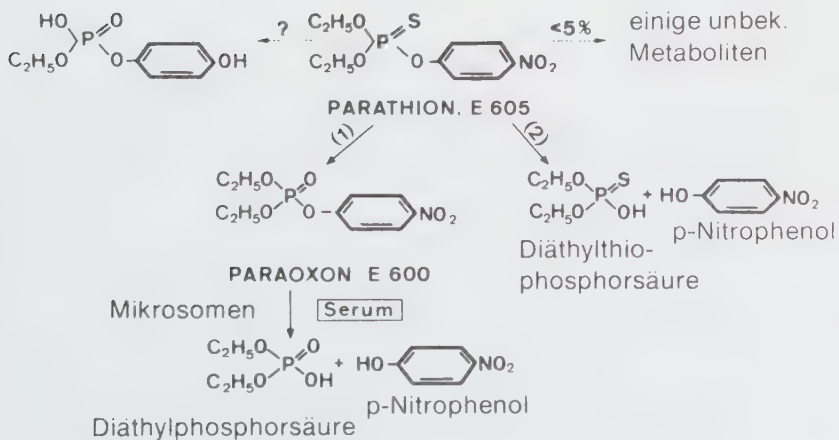
Parathion wird durch Oxidation in der Leber in Paraoxon übergeführt. Diese Reaktion wird als Giftung bezeichnet. Paraoxon seinerseits wirkt auf viele Fermentsysteme im Organismus hemmend. Diese Hemmung oder Blockade kommt durch Phosphorylierung bestimmter Zentren am Enzym zustande.

Nach NEAL (25) gibt es für den Metabolismus von E 605 vier Reaktionsmöglichkeiten:

1. Parathion wird deäthyliert
2. Parathion wird zu einigen unbekannten Metaboliten abgebaut
3. Parathion wird zu E 600 oxidiert (Hauptweg)
4. Parathion zerfällt durch hydrolytische Zersetzung in p-Nitrophenol und Diäthylthiophosphorsäure.

In Abbildung 4 sind die Reaktionswege 1. bis 4. zusammengefaßt.

Abb. 4: Metabolismus von Parathion im menschlichen Organismus nach NEAL (1967)



Im menschlichen Organismus wird Parathion folgendermaßen abgebaut:

Aus Parathion entsteht in den Leberzellen durch Oxidation das für den Organismus sehr toxische Paraaxon während der Giftungsreaktion. E 600 kann in vitro u.a. durch Zugabe von Lauge, im Organismus durch die Einwirkung der Paraaxonase in die ungiftigen Bestandteile p-Nitrophenol und Diäthylphosphorsäure gespalten werden, die dann mit dem Urin ausgeschieden werden. Das ungiftige, gelbe p-Nitrophenol hat sein Absorptionsmaximum bei 390 nm.

2.3 Klinik der Vergiftungen mit organischen Phosphorsäureestern (21)

MOESCHLIN (22) schätzt die Dosis letalis von Parathion für den Erwachsenen auf 4-15 mg/kg Körpergewicht bei Vergiftung mit reinem Wirkstoff; sie erhöht sich auf 8-30 mg bzw. 500 mg bei Intoxikation mit E 605-forte [®] bzw. E 605-Staub.

Für Kinder und Säuglinge werden erheblich niedrigere Werte angenommen. Daß eine Vergiftung mit Parathion stattgefunden hat, wird durch die erniedrigte Cholinesteraseaktivität bestätigt.

2.3.1 Vergiftungsmöglichkeiten

Die meisten Vergiftungen kommen in der Landwirtschaft vor, sei es durch Unachtsamkeit beim Versprühen der Pflanzenschutzmittel oder durch Nachlässigkeit, wenn beim Umgang mit organischen Phosphorsäureestern nur eine unzureichende Schutzkleidung getragen wird.

Zahlenmäßig niedriger liegen die Giftunfälle bei Kindern. In der Literatur (22) sind auch Fälle beschrieben worden, bei denen E 605 als Suizid- und Mordmittel verwendet wurde (vgl. Fall Christa Lehmann). Es sind Mordfälle bekannt, bei denen Personen mit E 605-haltigen Pralinen oder mit durch E 605 verunreinigten Augentropfen vergiftet worden waren.

2.3.2 Vergiftungssymptome

Die Vergiftungssymptomatik beschreibt das Bild einer endogenen Acetylcholinvergiftung, da der Abbau des körpereigenen Acetylcholins blockiert ist.

Nach KIMMERLE und LORKE (19) treten folgende Symptome bei einer Parathionvergiftung auf:

"Es treten Symptome wie bei einer Muskarinvergiftung durch Wirkung auf die postanglionären cholinergen Nerven auf, mit verstärkter Reizung der entsprechenden Erfolgsorgane.

Es treten Symptome wie bei einer Nikotinvergiftung durch Wirkung auf die vegetativen Ganglien und motorischen Endplatten auf, mit Lähmung nach anfänglicher Erregung.

Es treten Wirkungen auf das Zentralnervensystem auf, mit Erregung und terminaler Hemmung. Die Symptome der Vergiftungen können unterschiedlich stark sein. Ihre Intensität, der Zeitpunkt des Auftretens und ihre Dauer hängen von der Dosis und der Applikationsart ab."

Klinisch äußern sich die drei oben beschriebenen Vergiftungserscheinungen folgendermaßen:

Es müssen die Wirkungen an der parasympathischen Nervenendigung von den Wirkungen an den vegetativen Ganglien und motorischen Endplatten unterschieden werden. Zu den Symptomen, die durch Hemmung der Cholinesterase in postganglionären Nervenendigungen hervorgerufen werden, zählen ein vermehrter Tränen- und Speichelfluß, eine erhöhte Sekretion der Bronchialdrüsen, ein Bronchospasmus, hervorgerufen durch Muskelkontraktionen, mit Dyspnoe und erhöhter Erstickungsgefahr. Aufgrund einer gesteigerten Sekretion und Motilität des Magens und des Dünndarms können Spasmen, Koliken, Diarrhoen und Erbrechen ausgelöst werden.

Miosis und Akkommodationsstarre beeinträchtigen die Augenfunktion, hervorgerufen durch eine vermehrte Erregung des M. sphinkter pupillae iridis.

Kreislauffunktionsstörungen sind Folgeerscheinungen eines hyperpolarisierten AV-Knotens; es kommt zu Blutdruckabfall mit Kreislaufversagen, hervorgerufen durch eine Bradykardie des Herzens und eine Vasodilatation peripherer Gefäße.

Die Schweißdrüsen werden zu vermehrter Schweißabsonderung stimuliert.

An den vegetativen Ganglien und den motorischen Endplatten treten bei Parathionvergiftungen nikotinartige Wirkungen auf. Die dazugehörigen Symptome sind verschiedenster Art. Ist in erster Linie das zentrale Nervensystem betroffen, überwiegen cerebral bedingte Symptome wie Verwirrheitszustände, Angst, Bewußtseinsstörungen, psychische Veränderungen und ataktische Erscheinungen. Das Atemzentrum im Gehirn und

die Atem-(hilfs)muskulatur werden gelähmt. Im Hals- und Nackenbereich stellt sich eine Nackensteife ein, Parästhesien, Sprachstörungen, Tremor, Muskelzuckungen und tonisch-klonische Krämpfe der Willkürmuskulatur werden beobachtet.

Die Hauptursache für den letalen Ausgang einer Parathionvergiftung liegt in der Respirationsstörung, die durch Bronchokonstriktion, durch eine vermehrte Sekretion der Bronchialschleimhaut und die gelähmte Atemmuskulatur verursacht wird. Erstickungstod oder Tod nach Lungenödem aufgrund einer Linksherzinsuffizienz sind die Folge.

Die anschließende Tabelle 1 faßt die Vergiftungssymptome zusammen.

Tabelle 1: Vergiftungssymptomatik bei E 605-Vergiftungen

Geringe Dosen	Geringe Dampf- oder Aerosolkonzentrationen: lokale Effekte	Miosis am Auge Beeinträchtigung des Respirationstraktes mit vermehrter Sekretion, Husten an der Haut: lokales Muskelzittern, erhöhte Schweißsekretion
Größere Dosen	systemische Vergiftung: 1) muskarinartige Wirkung + 2) nikotinartige Wirkung + 3) Wirkungen am ZNS	Anorexie, Nausea, Schwitzen, epigastrischer und substernaler Druck, abdominelle Krämpfe, gesteigerte Peristaltik, Erbrechen, Diarrhoe, Speichelfluß, starke Schweißausbrüche, Blässe und Dyspnoe Muskelzittern, Muskelkrämpfe Ruhelosigkeit, Unbehagen, Schwindel, Angst, starke Kopfschmerzen, Schlaflosigkeit, Ataxie, Tremor, Verwirrungszustände, Koma, generalisierte Krämpfe Verschwinden der Reflexe Respirationsstörung: Bronchokonstriktion, starke Schleimbildung in den Bronchien, Lähmung der Atemmuskulatur und des zentralen Atemzentrums Lungenödem nach Linksherzinsuffizienz
Dosis letalis	systemische Vergiftung	

2.3.3 Therapie (22)

Jeder Patient, bei dem der Verdacht auf eine Phosphorsäureestervergiftung besteht, ist nach Einleitung der Sofortmaßnahmen und Atropininjektionen sofort in ein Krankenhaus einzuweisen und dort intensivmedizinisch zu überwachen.

Die Behandlung gliedert sich in eine Soforttherapie mit anschließender spezifischer Therapie.

Zur Soforttherapie gehören 5 Maßnahmen:

1. Bei perkutaner oder durch Inhalation erfolgter Vergiftung muß die Kleidung vollständig vom Körper entfernt werden. Anschließend wird 5 Minuten lang der ganze Körper mit Seife und Wasser, mit 75 %igem Alkohol und abschließend noch einmal mit Seife und Wasser gewaschen. Als Waschmittel eignen sich auch Ammoniaklösung, 5-10%ige Natriumbikarbonatlösung oder 1-2%ige Natriumhydroxydlösung.
2. Bei Kontamination der Augen mit der toxischen Substanz wird mit 3 %iger Bikarbonatlösung gewaschen, mit 1-2 Tropfen einer 1%igen Homatropinlösung und 0,4°/oo Novesin[®] bis zum Verschwinden der Augenschmerzen therapiert.
3. Bei oraler Vergiftung wird der Magen mit Tierkohle gespült, und nach der Spülung 20-30 mg Natriumsulfat als Abführmittel verabreicht.
4. Für die Schockprophylaxe und spezifische Behandlung wird ein venöser Zugang geschaffen und
5. zur eventuell nötig werdenden künstlichen Beatmung ein Intubationsbesteck bereitgehalten.

Die spezifische Behandlung zielt einerseits auf die Aufhebung der muskarinähnlichen Wirkung ab, die sich u.a. in Asthma, Darmkoliken und zentralnervösen Erscheinungen wie Krämpfen äußert, und andererseits auf die Durchbrechung der nikotinartigen Wirkung, d.h. auf die Aufhebung der neuromuskulären Blockade, die sich in Paralyse und Lähmung der Atemmuskulatur manifestiert hat. Die erstgenannte Wirkung kann durch hohe Atropindosen (Atropinum sulfuriam) unterbrochen werden. Initial verabreicht man 2-4 mg Atropin i.v., wiederholt die Dosis wegen der schnellen Abklingquote von Atropin alle 10-15 min, verabreicht über 24 Stunden ca. 20-30 mg, bei Bedarf auch mehr, bis die kardiopulmonalen Erscheinungen verschwinden und setzt die Therapie bei eingetretener Besserung des Zustandsbildes des Patienten für die nächsten Tage mit i.m. oder s.c.-Atropin-Injektionen fort.

Die nikotinartige Wirkung wird mit Toxogonin, Initialdosis 250 mg, behandelt.

Atropin und Toxogonin ergänzen sich in ihrer Wirkung. Die Atropininjektion hat immer vor der Toxogoninverabreichung zu erfolgen, da Atropin im Gegensatz zu Toxogonin schneller wirkt und deshalb lebensrettend sein kann. Vorsicht ist bei der Dosierung von Toxogonin im Vergleich zu der immer wieder erneut möglichen und gefahrlosen Injektion von Atropin deshalb geboten, weil bei einer Toxogonindosierung "nach Wirkung" sehr leicht Überdosierungserscheinungen, wie Laryngospasmus, Kammerflattern und -flimmer auftreten können.

Bei der intensivmedizinischen Behandlung lebensbedrohlich vergifteter Patienten wird prophylaktisch eine antibiotische Abschirmung gegen pulmonale Infekte durchgeführt, die Alkaliereserve kontrolliert und gegebenenfalls mit Calciumglukonat behandelt. Bei besonders schweren Vergiftungen kann eine Hämoperfusion versucht werden. Außerdem ist darauf zu achten, daß bei der Therapie keine krampfauslösenden bzw. krampfverstärkenden Medikamente wie z.B. Theophyllin- und Aminophyllin-Derivate, Phenothiazin und Morphin- oder Dolantin-Präparate verwendet werden.

3. Problemstellung

Aufgrund der Tatsache, daß in letzter Zeit Vergiftungsunfälle, Suizide und kriminelle Verbrechen mit Organophosphaten -speziell auch mit Parathion- zugenommen haben, daß durch deren Anwendung der Mensch und die Tierwelt bedroht sind, sahen sich Wissenschaftler aufgefordert, nach einem wirksamen Schutz bei eingetretener Vergiftung zu suchen. Die Schutzmaßnahmen sollen prophylaktisch angewendet werden können und vor allem nach Eintritt von Vergiftungserscheinungen schnell und zuverlässig wirken. Bis jetzt setzt man als Mittel der Wahl bei Vergiftungen mit E 600 das Parasympatholytikum Atropin und Toxogonin ein.

Auf der Suche nach einem Antagonisten für E 600 fand man im menschlichen wie im Tierserum das E 600-spezifische Enzym Paraoxonase, das Paraoxon enzymatisch in ungiftige Bestandteile zerlegt, die vom Körper ausgeschieden werden können.

Ziel dieser Arbeit ist es, Tierarten zu finden, die im Serum über hohe Paraoxonaseaktivitäten verfügen bzw. solche Tierarten, die nahezu kein Paraoxon im Serum enthalten.

4. Experimentelle Untersuchungen

=====

4.1 Methodik und Untersuchungsmaterialien

4.1.1 Art der Meßmethode

Die in dieser Arbeit erhaltenen Meßergebnisse beruhen auf der kinetisch-spektrophotometrisch bestimmten Enzymaktivität der Paraoxonase.

Das angewandte Verfahren ist eine Variante der von KRISCH angegebenen Methodik.

Zum Vergleich der von KRISCH angegebenen Arbeitsweise und der in dieser Arbeit angewandten wird die Bestimmung von Paraoxonaseaktivität nach KRISCH im folgenden kurz beschrieben:

4.1.1.1 Standardmethode nach KRISCH (20)

Die enzymatische Hydrolyse von E 600 durch Paraoxonase im menschlichen Serum wird über eine kinetische Enzymaktivitätsbestimmung im Spektralphotometer gemessen. Als Maß für die Enzymaktivität wird hierbei die Geschwindigkeit der Freisetzung des Paraoxon-Spaltprodukts Paranitrophenol aus dem Substrat Paraoxon bestimmt.

Verwendete Lösungen:

-0,1 M Glycin-Natronlauge-Puffer mit pH = 11,2

-E 600-Stammlösung: 12 mmol/l E 600 werden in 100 mmol/l

Tris-HCl-Puffer mit pH = 8,0 gelöst.

Zum Gebrauch wird die E 600-Stammlösung mit Aqua bidest 1:5 verdünnt.

-Serum mit 0,9%iger Kochsalzlösung 1:5 verdünnt.

Versuchsansatz:

In eine Küvette mit Schichtdicke $d = 1$ cm werden pipettiert:

- 1,65 ml Glycin-Natronlauge-Puffer
- + 0,25 ml 1:5 verdünntes Serum
- + 0,5 ml 1:5 verdünnte E 600-Stammlösung.

Es muß darauf geachtet werden, daß alle Lösungen auf 25° C vortemperi-
ert sind, und diese Temperatur während der Messung konstant gehalten wird.

Messung:

Zur Bestimmung der Enzymaktivität der Paraoxonase wird bei einer Versuchstemperatur T von 25° C und einer Wellenlänge $\lambda = 405$ nm die Geschwindigkeit der Freisetzung von Paranitrophenol aus Paraoxon im Photometer gemessen. Die Messung der Extinktionsänderung beginnt 30 s nach dem Reaktionsstart und endet nach weiteren 150 s. Aus der Extinktionsänderung ΔE , die über eine Zeit t von 2,5 min gemessen wird, läßt sich unter Berücksichtigung eines Leerwertes, bei dem an Stelle von Serumverdünnung Kochsalzlösung verwendet wird, die Paraoxonaseaktivität wie folgt berechnen:

KRISCH: "Zur Umrechnung der Extinktionsdifferenzen in nMol wird der molare Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol (in Glycin-NaOH-Puffer pH = 11,2) $\epsilon_{405 \text{ nm}} = 18,05 \cdot 10^6 \text{ cm} \cdot \text{Mol}^{-1}$ zugrunde gelegt. 10 nMol p-Nitrophenol gelöst in 1 ml hätten danach (bei $d = 1$ cm und $\lambda = 405$ nm) eine Extinktion von 0,1805. Unter weiterer Berücksichtigung der Serumverdünnung (Umrechnung von ml Serum durch Multiplikation mit 20), der Meßzeit (Umrechnung auf 1 Min. durch Division durch 2,5) und des Ansatzvolumens (2,4 ml; Multiplikation mit 2,4) errechnet sich die Aktivität (in $\mu \text{ Mol} \cdot \text{Min}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$ Serum) nach folgender Formel:

$$\text{Aktivität} = \frac{\Delta E \cdot 10 \cdot 2,4 \cdot 20}{0,1805 \cdot 2,5} = \Delta E \cdot 1063 \text{ (U/l Serum)} "$$

4.1.1.2 Modifikation der Enzymaktivitätsbestimmung nach KRISCH (Abk.: mod. Krisch-Test)

4.1.1.2.1 Versuchsdurchführung

Analog dem oben beschriebenen Verfahren nach KRISCH wird die enzymatische Hydrolyse von E 600 durch die Paraoxonase des Human- bzw. Tiereserums im modifizierten Krischversuch auch durch eine kinetisch-spektrophotometrische Enzymaktivitätsmessung bestimmt.

Untersuchungsmaterial:

- Humanserum
- Serum von Kaninchen, Rind, Schwein, Schaf, Pferd, Huhn

Das zu untersuchende Serum wird durch 15 min dauerndes Zentrifugieren bei 3000 Umdrehungen/min aus frischem Vollblut gewonnen. Spätestens drei Tage nach der Zentrifugierung und einer Serumlagerung bei + 4° C im Kühlschrank wird die Enzymaktivität bestimmt.

Verwendete Geräte:

- Spektralphotometer Beckmann Modell 24
- Beckmann Recorder/Controller
- Zentrifuge mit Zentrifugengläsern
- Ultraschallbad
- Wasserbad
- Stoppuhr
- Pipetten: Eppendorfpipetten
Vollpipette
Enzymtestpipette
Capilettor
- Pipettierhilfen
- Reagensglasständer mit Reagensgläsern
- Becherglas (300 ml), Standzylinder (1,5 l)
Erlenmeyerkolben (150 ml)

- 2 Küvetten ($d = 1 \text{ cm}$)
- Glasspatel, Spritzflasche für Aqua bidest, Einmalhandschuhe

Reagenzien und Lösungen:

- Reagenzien:
 - E 600 oder Paraoxon
 - Bis-Tris-Propane
 - Calciumchlorid $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - Titriplex II
 - Taurocholsäure
 - 0,1 N Salzsäure
- Lösungen:
 - Bis-Tris-Propan-Puffer:

In ca. 800 ml Aqua bidest werden 28,22 g Bis-Tris-Propane, 4,3 g Kochsalz, 1,176 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4,4 mg Titriplex II und 20 mg Taurocholsäure gelöst. Bei 30°C wird der Puffer mit 0,1 N HCl-Lösung auf $\text{pH} = 9,5$ eingestellt, anschließend mit Aqua bidest auf fast 1,00 l aufgefüllt unter ständiger pH-Kontrolle und eventueller pH-Korrektur auf $\text{pH} = 9,5$.
 - E 600-Gebrauchslösung:

In 100 ml Bis-Tris-Propan-Puffer werden 100 μl unverdünntes E 600 pipettiert (im Abzug arbeiten! Einmalhandschuhe verwenden!). Zur Herstellung einer homogenen Emulsion von E 600 im Puffer wird die Anwendung eines Ultraschallbades empfohlen. Man verfährt am besten so, daß man von Hand den verschlossenen Erlenmeyerkolben kräftig schüttelt und dann wieder für wenige Minuten den Ultraschall zur Emulsionsbildung anwendet. Die Vollständigkeit des Lösungsvorgangs ist daran zu erkennen,

daß sich am Boden des Gefäßes keine E 600-Tröpfchen mehr absetzen. Die Lösung ist übersättigt und entmischt sich im Laufe der Zeit. Deswegen ist vor jeder Probenentnahme die oben angegebene Mischprozedur solange zu wiederholen, bis keine E 600-Tröpfchen mehr erkennbar sind. Die Gebrauchslösung ist nicht sehr stabil; sie wird deshalb im Kühlschrank bei + 4° C aufbewahrt. Nach maximal 1,5 Stunden muß sie infolge zu großer Eigenhydrolyse des Paraoxons verworfen werden. Für die jeweiligen Messungen werden im voraus maximal 4 Volumenansätze der E 600-Gebrauchslösung aus dem Kühlschrank herausgenommen und im Wasserbad auf 30° C erwärmt. Aufgrund der zunehmenden Eigenhydrolyse von Paraoxon mit steigender Temperatur und bei Lichteinwirkung werden unter Umständen falsch niedrige Paraoxonaseaktivitäten gemessen.

Zum Aufbewahren und Pipettieren von E 600 und dessen konzentrierten Lösungen werden alkalifreie Glasgefäße bzw. Glaspipetten benötigt. Auf vollständige Entfernung von Alkaliresten, die von der Entgiftung mit Natronlaugeplättchen herrühren, ist besonders zu achten.

Versuchsansatz:

In die Meßküvette (d = 1 cm) wird folgender Ansatz pipettiert:

- 2,5 ml E 600-Gebrauchslösung
- 50 µl unverdünntes Serum
(Erhöhung der Serummenge auf 100 µl
bzw. 200 µl bei kleinsten Enzymaktivitäten!)

Vorbereitung der Meßgeräte:

Vor Beginn der eigentlichen Messung werden folgende Versuchsbedingungen überprüft: Spektralphotometer mit Küvetten und Wasserbad sind auf 30° C vorgewärmt. Die Wellenlänge λ am Spektralphotometer ist auf $\lambda = 390 \text{ nm}$ eingestellt.

Eichung des Photometers: Der Nullabgleich des Photometers erfolgt mit Hilfe der in den Strahlengang gebrachten Referenz- und Probenküvette, beide mit Puffer gefüllt.

Bei der Leerwertbestimmung zur Messung der Geschwindigkeit der nicht-enzymatischen Eigenhydrolyse von E 600 ist die Referenzküvette mit Puffer, die Probenküvette mit E 600-Gebrauchslösung gefüllt, bei der eigentlichen Aktivitätsmessung die Referenzküvette mit E 600-Gebrauchslösung, die Probenküvette mit dem Versuchsansatz.

Wichtig: Inhalt der Referenzküvette nach jeder 2. Messung verwerfen; Probenküvette nach jeder Messung mit E 600-Gebrauchslösung spülen.

Messung:

Die mit dem Versuchsansatz gefüllte, gut mit einem Glasspatel durchmischte Probenküvette wird in den Strahlengang des Photometers gebracht. Gemessen wird gegen die Referenzküvette zur Berücksichtigung des Leerwertes, die Extinktionsänderung über einen Zeitraum von 3 min aufgezeichnet; der erste Meßwert wird 30 s nach der Inkubation des Serums in die Küvette abgelesen, der letzte Meßwert nach weiteren 180 s.

Gefahren beim Umgang mit E 600:

Das äußerst toxische E 600 kann bei den oben beschriebenen Arbeiten perkutan resorbiert oder Spuren der Dämpfe können inhaliert werden. Beim Umgang mit konzentrierten Lösungen von E 600 sind deshalb Schutzhandschuhe zu tragen und Pipettierhilfen zu benutzen. Die Arbeitsräume werden gut belüftet (Abzug einschalten, Fenster leicht öffnen). Beim Umgang mit den sehr alkalischen Entgiftungslösungen soll eine Schutzbrille getragen werden. Versehentlich verschüttete E 600-Lösungen können durch Natriumkarbonat (Na_2CO_3) wasserfrei aufgesaugt und anschließend relativ gefahrlos beseitigt werden.

4.1.1.2.2 Berechnung der Aktivität

Die Aktivität A eines Enzyms läßt sich definieren als Umsatz eines Substrats pro Zeiteinheit:

$$A = \frac{\Delta C}{\Delta t}$$

(Gleichung 1)

mit A: Aktivität

ΔC : Konzentrationsänderung des Substrats

Δt : Zeiteinheit

Bei der photometrischen Bestimmung einer Enzymaktivität ist, falls das Lambert-Beersche Gesetz Gültigkeit besitzt, die Aktivität proportional zur Konzentrationsänderung des Substrats oder dessen Umsatzprodukten.

$$c = \frac{E}{\epsilon \cdot d} \cdot \frac{V}{v}$$

Lambert-Beersches-Gesetz unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors

(Gleichung 2)

mit c: Konzentration des Paranitrophenol

E: Extinktion

d: Schichtdicke der Küvette

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient

($\epsilon_{\text{Krisch}} = 18,05 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{Mol}^{-1}$)

V: Gesamtansatzvolumen

v: Serumvolumen

Die Aktivität A berechnet sich aus Gleichungen 1 und 2 wie folgt:

$$A = \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\epsilon \cdot d} \cdot \frac{V}{v}$$

(Gleichung 3)

Aus Gleichung 3 berechnet sich die Aktivität A unter Berücksichtigung der Versuchsbedingungen wie folgt:

Versuchsbedingungen:

$\frac{\Delta E}{\Delta t}$: Extinktionsänderung pro Zeitänderung

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient

$$\epsilon = 18,05 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{Mol}^{-1}$$

V : Gesamtansatzvolumen: 2,55 ml

v : Serumvolumen: 0,05 ml

d : Schichtdicke 1 cm

$$A = \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot \frac{1}{18,05 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}} \cdot \frac{2,55 \text{ ml}}{0,05 \text{ ml}}$$

$$A = \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot 2820 \text{ } \mu\text{Mol/l}$$

(Gleichung 3a)

mit $\frac{\Delta E}{\Delta t}$: Extinktionsänderung
gemessen über 3 min

oder

$$A = \Delta E \cdot 940 \frac{\mu\text{Mol}}{\text{l} \cdot \text{min}}$$

(Gleichung 3b)

mit ΔE : Extinktionsänderung
gemessen über 1 min
 $\Delta t = 1 \text{ min}$

"Die Konzentration einer Enzymaktivität in Lösung wird in Einheiten/Volumen (U/l , mU/ml bzw. $\mu\text{kat/l}$) angeben."

"Eine Einheit (U = Unit) ist die Enzymmenge, welche die Umwandlung von 1 μMol Substrat/Min katalysiert.

Eine katalytische Einheit (kat = Katal) ist die Enzymmenge, welche die Umwandlung von 1 Mol Substrat/sec katalysiert.

Ein U (1 $\mu\text{Mol/Min}$) = 1/60 μkat (16,67 nkat)". (7)

$$A = \Delta E \cdot 940 \text{ U/l}$$

(Gleichung 3c)

4.1.1.2.3 Versuchsauswertung, dargestellt am Beispiel einer Präzisionsbestimmung

Bei der Präzisionsbestimmung wurde in 12 aufeinanderfolgenden Messungen die Aktivität der Paraoxonase in einem Humanserum bestimmt, die Standardabweichung s und der Variationskoeffizient VK berechnet.

Die mittlere Enzymaktivität $\bar{A}$ errechnet sich folgendermaßen:

$$\bar{A} = \frac{\sum_{i=1}^n A_n}{n} \quad \text{(Gleichung 4)}$$

mit $\sum_{i=1}^n A_n$: Summe der Einzelaktivitäten
 n : Anzahl der Messungen

Die Standardabweichung s (Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert) berechnet sich nach folgender Formel:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (A_n - \bar{A})^2}{n-1}} \quad \text{(Gleichung 5)}$$

mit A_n : Einzelaktivität der n -ten Messung
 $\bar{A}$: mittlere Aktivität
 n : Anzahl der Messungen

Der Variationskoeffizient VK (prozentuale Abweichung der Standardabweichung vom Mittelwert) berechnet sich aus der Standardabweichung:

$$VK = \frac{s}{\bar{A}} \cdot 100 \%$$

(Gleichung 6)

mit s : Standardabweichung
 $\bar{A}$: mittlere Aktivität

In der nachfolgenden Tabelle 2 sind die Einzelmeßergebnisse, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient der Präzisionsbestimmung zusammengefaßt:

Tabelle 2: Meßergebnisse der Präzisionsbestimmung

Nr. der Messung		Aktivität in U/l (mod. Krisch-Test)
	1	369,3
	2	383,2
	3	381,0
	4	390,0
	5	392,4
	6	380,0
	7	379,0
	8	373,0
	9	381,0
	10	374,0
	11	369,0
	12	365,0
Mittlere Aktivität $\bar{A}$		378,0
Standardabweichung s		8,31
Variationskoeffizient VK		2,4 %

Die Ergebnisse enzymkinetischer Meßverfahren sind aussagekräftig, wenn der Variationskoeffizient unter 10 % liegt.

4.1.1.3 Vergleich beider Meßmethoden

Die beiden unter 4.1.1.1 und 4.1.1.2 beschriebenen Meßverfahren zur Bestimmung der Paraoxonaseaktivität im Serum unterscheiden sich in erster Linie in ihrer Zielsetzung:

Das herkömmliche Meßverfahren nach KRISCH zielt auf die Differenzierung der Paraoxonaseaktivitäten in die drei Typen niedrige, mittlere und hohe Aktivität ab unter Verwendung von kleinen E 600 Konzentrationen im Meßansatz, bedingt durch die relativ geringe Löslichkeit von E 600 in wässrigem Medium.

Der modifizierte Krisch-Test strebt die Bestimmung kleinster Enzymmengen mit Hilfe hoher E 600-Konzentrationen im Meßansatz an, ermög-

licht durch den Zusatz eines Emulgators.

Weiterhin wird mit der neuen Methode versucht, die Korrelation zwischen in vitro und in vivo Bedingungen zu verbessern und durch Verminderung der Anzahl der Arbeitsschritte und Vereinfachung des Meßverfahrens mögliche Fehlerquellen zu reduzieren.

Der Blut pH-Wert liegt bei 7,4; das pH-Optimum der enzymatischen Hydrolyse von Paraoxon liegt bei pH = 11,2, das Absorptionsmaximum für Paranitrophenol im Glycin-Natronlauge-Puffer bei $\lambda = 405$ nm. Im modifizierten Meßverfahren wird ein Puffer verwendet, dessen pH-Wert etwas außerhalb des Aktivitätsoptimums für die Paraoxonase liegt, jedoch reproduzierbare pH-Werte im Meßansatz ermöglicht. Das Absorptionsmaximum für Paranitrophenol liegt im modifizierten Test bei $\lambda = 390$ nm, die Versuchstemperatur T bei 30° C gegenüber 25° C beim Meßverfahren nach KRISCH.

In der nachfolgenden Tabelle 3 sind die beiden Meßverfahren einander gegenübergestellt.

Tabelle 3: Vergleich zwischen Krischtest und mod. Krisch-Versuch

	Krisch	mod. Krisch
Testziel	Differenzierung der Aktivitäten in - niedrig - mittel - hoch	Bestimmung geringer und geringster Enzymaktivitäten
E 600-Konzentration	klein	groß
Puffer	Glycin-Natron-Lauge-Puffer	Bis-Tris-Propan-Puffer
Puffer-pH	11,2	9,5
Absorptionsmaximum für Paranitrophenol	$\lambda = 405$ nm	$\lambda = 390$ nm
Meßtemperatur	T = 25° C	T = 30° C
Versuchsansatz	1,65 ml Glycin-NaOH-Puffer + 0,25 ml 1:5 verdünntes + 0,5 ml 1:5 verdünnte E 600-Stammlösung	2,5 ml E 600-Gebrauchslösung + 0,05 ml Serum

Experimentelle Untersuchungen zur Aktivitätsbestimmung der Paraoxonase im Humanserum mit Hilfe der beiden Tests haben gezeigt, daß zwischen den gemessenen Enzymaktivitäten in beiden Tests für ein Serum kein direkter Zusammenhang besteht. Lediglich folgende Tendenzen werden deutlich:

Seren mit niedriger Enzymaktivität -nach der Krischmethode gemessen- zeigen im modifizierten Versuch deutlich höhere Aktivitäten (mehr als 2 mal so hoch), Seren mit mittleren Enzymaktivitäten haben im modifizierten Versuch etwa doppelt so hohe Werte und Seren mit hohen Enzymaktivitäten nach KRISCH zeigen nach der modifizierten Meßmethode nur geringgradig höhere Enzymaktivitäten.

4.2 Ergebnisse der experimentellen Paraoxonaseaktivitätsbestimmungen im Human- und Tierserum

Die Serumparaoxonaseaktivität der folgenden sechs Tierarten wird in dieser Arbeit untersucht: Kaninchen, Rind, Schwein, Schaf, Pferd und Huhn. Zur Untersuchung mit dem unter 4.1.1.2 beschriebenen mod. Krisch-Test wird in der Regel ein Kollektiv von 30 Tieren pro Tierart herangezogen. Es ist anzunehmen, daß bei dieser Kollektivgröße auch durch einen eventuell vorliegenden Enzympolymorphismus, die Frage nach einer im Serum vorhandenen Paraoxonaseaktivität beantwortet werden kann.

Zu Vergleichszwecken wurde auch eine Versuchsreihe mit Humanserum ausgeführt.

Die Meßergebnisse sind im folgenden tabellarisch zusammengestellt, die Herkunft der Seren ist jeweils in den Legenden zu den Tabellen angegeben. Die Diskussion der Ergebnisse schließt sich in Kapitel 5 an.

4.2.1 Paraoxonaseaktivität im Humanserum

Das Serum stellte die Blutbank der Chirurgischen Universitätsklinik Erlangen zur Verfügung.

Tabelle 4: Paraoxonaseaktivität im Humanserum

Nr. des Probanden	Geschlecht m: männlich w: weiblich	Geburtsjahr	Aktivität in U/l (mod. Krisch-Test)
1	m	1952	180
2	m	1946	102
3	m	1938	117
4	m	1953	231
5	w	1958	406
6	w	1954	521
7	m	1958	167
8	m	1960	221
9	m	1955	177
10	m	1949	408
11	m	1943	307
12	m	1931	196
13	m	1925	99
14	m	1958	178
15	m	1946	174
16	m	1932	101
17	m	1953	247
18	m	1936	179
19	m	1930	345
20	m	1934	196
21	m	1940	301
22	m	1949	145
23	m	1959	353
24	w	1959	114
25	m	1947	484
26	m	1947	330
27	m	1951	452
28	w	1954	242

Fortsetzung Tabelle 4

Nr. des Probanden	Geschlecht m: männlich w: weiblich	Geburtsjahr	Aktivität in U/l (mod. Krisch-Test)
29	w	1948	228
30	w	1957	210
31	w	1955	288
32	w	1955	339
33	m	1957	378
34	m	1958	373
35	w	1952	486

4.2.2 Paraoxonaseaktivität im Kaninchenserum

Das Blut der ersten 10 Versuchstiere stammt aus dem Erlanger Institut für Rechtsmedizin, das Blut der übrigen 20 aus dem Erlanger Institut für Umwelthygiene und Präventivmedizin.

Tabelle 5: Paraoxonaseaktivität im Kaninchenserum

Probanden-Nr.	Aktivität in U/l (mod. Krisch-Test)
1	1671
2	2371
3	2299
4	1920
5	2050
6	2548
7	1772
8	1740
9	2013
10	1440
11	1918
12	2146
13	1004
14	1496
15	1925
16	2234

Fortsetzung Tabelle 5

Probanden-Nr.	Aktivität in U/l (mod. Krusch-Test)
17	1495
18	1957
19	803
20	1177
21	1544
22	1107
23	1089
24	1537
25	1181
26	1384
27	837
28	1923
29	1929
30	1495

4.2.3 Paraoxonaseaktivität im Rinderserum

Das Blut stammt aus dem Erlanger Schlachthof.

Tabelle 6: Paraoxonaseaktivität im Rinderserum

Probanden-Nr.	Geschlecht	Aktivität in U/l (mod. Krusch-Test)
1	m	37
2	m	57
3	m	55
4	m	52
5	m	53
6	m	58
7	m	37
8	m	39
9	m	94
10	m	50
11	m	69
12	m	58
13	m	83

Fortsetzung Tabelle 6

Probanden-Nr.	Geschlecht	Aktivität in U/l (mod. Krisch-Test)
14	m	50
15	m	75
16	m	43
17	m	30
18	m	21
19	m	48
20	m	30
21	w	112
22	w	117
23	w	130
24	w	136
25	w	110
26	w	124
27	w	134
28	w	163
29	w	151
30	w	138

4.2.4 Paraoxonaseaktivität im Schweineserum

Das Blut stellte der Erlanger Schlachthof zur Verfügung.

Tabelle 7: Paraoxonaseaktivität im Schweineserum

Probanden-Nr.	Geschlecht m: männlich w: weiblich	Aktivität in U/l (mod. Krisch-Test)
1	w	16
2	w	15
3	w	10
4	w	10
5	w	8
6	w	14
7	w	13
8	w	6
9	w	12

Fortsetzung Tabelle 7:

Probanden-Nr.	Geschlecht	Aktivität in U/l (mod. Krisch-Test)
10	w	13
11	w	15
12	w	14
13	w	13
14	w	17
15	w	12
16	w	13
17	w	9
18	w	14
19	w	13
20	w	12
21	m	12
22	m	13
23	m	8
24	m	14
25	m	11
26	m	8
27	m	9
28	m	10
29	m	17
30	m	14

4.2.5 Paraoxonaseaktivität im Schafserum

Das Blut stammt von einer Schafherde aus der Nähe von Schlüsselfeld.

Tabelle 8: Paraoxonaseaktivität im Schafserum

Probanden-Nr.	Aktivität in U/l (mod. Krisch-Test)
1	222
2	242
3	161
4	138
5	161
6	143

Fortsetzung Tabelle 8

Probanden-Nr.	Aktivität in U/l (mod. Krisch-Test)
7	nicht auswertbar
8	115
9	192
10	175
11	120
12	339
13	353
14	272
15	85
16	90
17	9
18	18
19	212
20	221

4.2.6 Paraoxonaseaktivität im Pferdeserum

Das Blut stellte der Erlanger Schlachthof zur Verfügung.

Tabelle 9: Paraoxonaseaktivität im Pferdeserum

Probanden-Nr.	Aktivität in U/l (mod. Krisch-Test)
1	328
2	275
3	120
4	205
5	85

4.2.7 Paraoxonaseaktivität im Hühnerserum

Das Blut stellte ein Bauer aus Bernheck in der Nähe von Pegnitz zur Verfügung.

Tabelle 10: Paraoxonaseaktivität im Hühnerserum

Probanden-Nr.	Aktivität in U/l (mod. Krisch-Test)
1	3,5
2	1,2
3	1,8
4	2,8
5	1,2
6	0,7
7	1,5
8	1,7
9	1,2
10	2,0
11	1,5
12	nicht auswertbar
13	0,2
14	1,1
15	0,7
16	1,4
17	0,1
18	0,2

4.2.8 Paraoxonaseaktivität im Reh- und Eselserum

Tabelle 11: Paraoxonaseaktivität im Reh- und Eselserum

	Aktivität in U/l (mod. Krisch-Test)
Reh	200
Reh	101
Esel	588

5. Diskussion

=====

Frisches Blut verschiedener Tierarten wurde sofort nach der Entnahme zentrifugiert. Leichte Hämolyse fand sich beim Schweine- und Hühnerblut. Maximal drei Tage nach der Blutentnahme wurde die Aktivität der Serum-paraoxonase mit einem mod. Verfahren nach KRISCH photometrisch bestimmt.

In der folgenden Tabelle 12 sind die Versuchsergebnisse nach fallenden, mittleren Aktivitäten geordnet.

Tabelle 12: Zusammenfassung der Meßergebnisse im Überblick

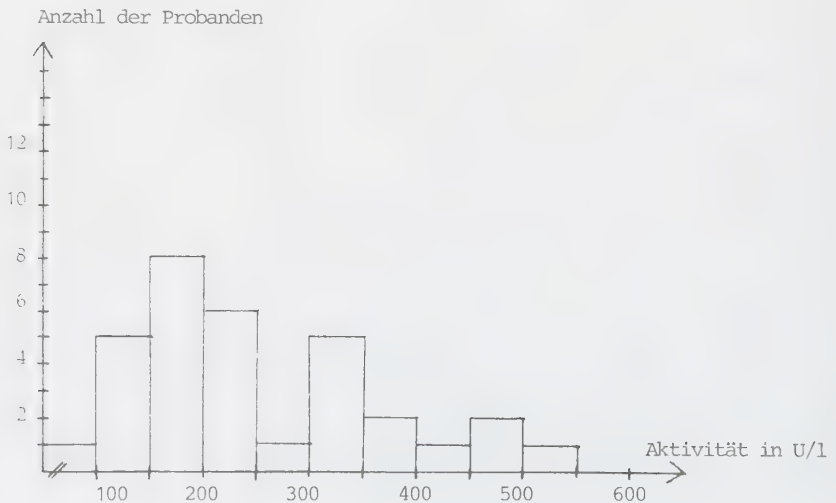
	Größe des Kollektivs	Geschlechtsverteilung m: männlich w: weiblich	Aktivität in Abhängigkeit vom Geschlecht in U/l	mittlere Aktivität $\bar{A}$ des Kollektivs in U/l
Kaninchen	30			1849
Esel	1	m: 1		588
Mensch	35	m: 25 w: 10	m: 243 w: 303	259
Pferd	5			203
Schaf	20	w: 20 1 nicht auswertbar		172
Reh	2	w: 2		150
Rind	30	m: 20 w: 10	52 131	78,5
Schwein	30	m: 10 w: 20	11,6 12,6	12,3
Huhn	18	1 nicht auswertbar		1,3

Das Kaninchen verfügt bei weitem über die höchste Enzymaktivität, es folgen mit mittleren Aktivitäten Mensch, Pferd, Esel, Schaf und Reh, mit niedriger Aktivität Rind und Schwein. Hühnerblut weist nur noch Enzymspuren auf.

Es muß bei dieser Betrachtung berücksichtigt werden, daß die untersuchten Kollektive der Tierarten Pferd, Esel und Reh zahlenmäßig zu klein sind, und deshalb deren errechnete Aktivitätshöhe nicht unbedingt als repräsentativ für die untersuchte Tierart anzusehen ist.

Die Aktivitätsverteilung der Paraoxonase im Humanserum entspricht im Wesentlichen der bereits bekannten, genetisch determinierten Differenzierung in die drei Typen mit hoher, mittlerer und niedriger Aktivität.

Abb.: 5: Graphische Darstellung der Paraoxonaseaktivitätsverteilung in Humanserum (n = 35)



Die graphische Darstellungen der Paraoxonaseaktivitäten des Kaninchen-, Schwein- und Schafserums entsprechen im Wesentlichen einer Gauß'schen Verteilungskurve:

Abb. 6: Graphische Darstellung der Aktivitätsverteilung der Paraoxonase im Kaninchenserum ($n = 30$)

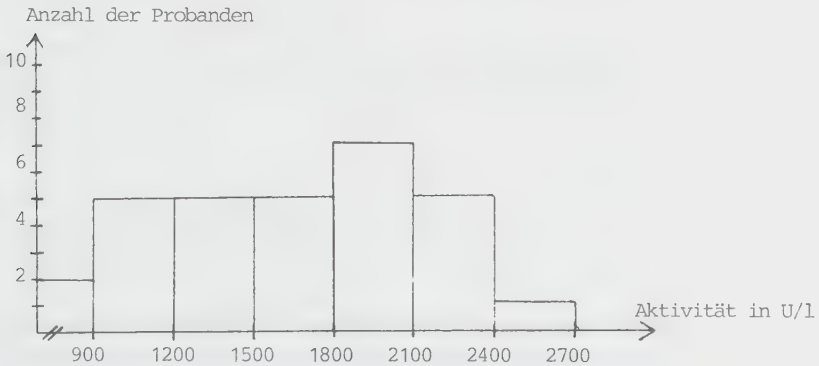


Abb. 7: Graphische Darstellung der Aktivitätsverteilung der Paraoxonase im Schweineserum ($n = 30$)

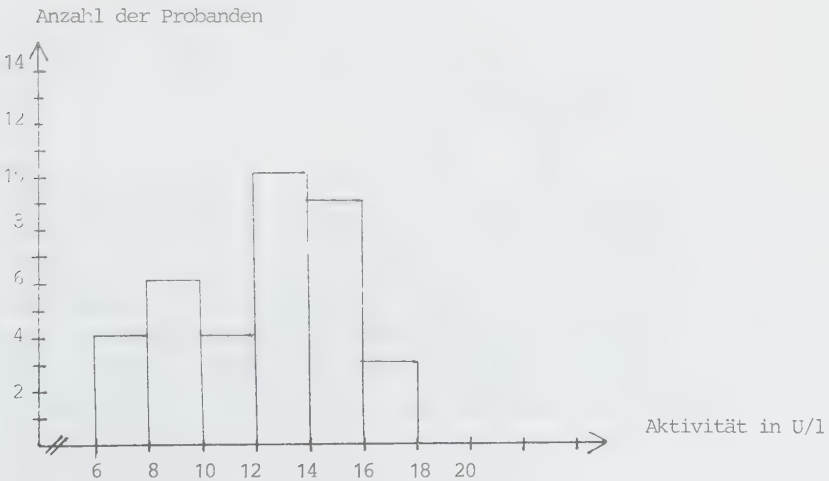
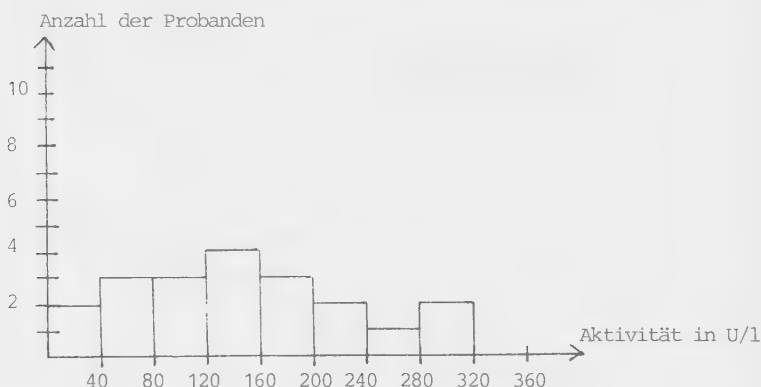


Abb. 8: Graphische Darstellung der Aktivitätsverteilung der Paraoxonase im Schafserum (n = 20)



Bei der Auswertung des Ergebnisses der Rinderseren fällt eine geschlechtsspezifische Abhängigkeit der Aktivitäten auf: männliche Tiere haben niedrigere Paraoxonaseaktivitäten als weibliche Tiere. Bei der Untersuchung von Schweineserum konnte keine Geschlechtsabhängigkeit in der Höhe der Enzymaktivität festgestellt werden. Alle Tiere haben sehr kleine Aktivitätswerte.

Im Hühnerserum sind nur noch Enzymspuren nachzuweisen.

Die in der Problemstellung gesuchten Tierarten mit hoher Paraoxonaseaktivität sind Kaninchen, Pferd und Schaf, solche mit niedriger Enzymaktivität Schwein und Huhn.

Aufgrund ihrer Körpergröße bzw. ihres großen Blutvolumens kommen für die angesprochene Enzymextraktion die Tierarten Pferd und Schaf evtl. noch Kühe infrage und Kaninchen wegen sehr hohen Enzymaktivitäten. Bei Schweinen und Hühnern ist zu überlegen, ob aufgrund der niedrigen Aktivität der Paraoxonase eine Art aktive Immunisierung versucht werden sollte, mit dem Ziel, ein Antiserum bzw. Antidot für E 600-Vergiftungen zu gewinnen.

6. Zusammenfassung

Abschließend sei auf eine Untersuchung von ALDRIDGE (1,2) hingewiesen, der bereits im Jahre 1952 die Enzymaktivität der Phosphorylphosphatase in verschiedenen Tierseren untersuchte, die durch Paraoxon vergiftet worden waren. Die Tatsache, daß bei ALDRIDGE die Kollektivgröße der einzelnen Tierspezies nicht angegeben ist, und ein anderes Meßverfahren zugrunde liegt, erklärt u.a. die verschiedenen Enzymaktivitäten der gleichen Tierspezies. Beim Vergleich ist auch daran zu denken, daß zwei unterschiedliche Meßverfahren zugrunde liegen.

Folgende Tabelle 13 zeigt einen Vergleich zwischen den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen und den 1952 von ALDRIDGE gemessenen Enzymaktivitäten:

Tabelle 13

Spezies	Aktivität in U/l eigene Untersuchungen	Aktivität in U/l Aldridge 1952
Mensch	259	400
Kaninchen	1849	5200
Rind	78,5	110
Schwein	12,3	
Schaf	172	350
Pferd	203	50
Huhn	1,3	
Reh	150	
Esel	588	
Hund		200
Meerschweinchen		150
Ratte		80

Man erkennt, daß Kaninchen, aufgrund ihrer extrem hohen Paraoxonaseaktivität, daß Esel, Pferd und Schaf aufgrund relativ hoher Enzymaktivitäten und großer Blutmengen evtl. für eine Enzymreindarstellung infrage kämen, während Hühner, Schwein und evt. Rind eher dem Versuch einer Immunisierung mit Paraoxon zur Antiserumgewinnung zugeführt werden sollten.

1. Literaturverzeichnis

- (1) ALDRIDGE, W.N.:
Serum esterases
Two types of esterases (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl-
acetate, propionate and butyrate, and method for their determi-
nation
Biochem.J. 53, 110-117 (1953)
- (2) ALDRIDGE, W.N.:
Serum esterases
An enzyme hydrolysing diethyl-p-nitro-phenylphosphate (E 600)
and its identity with the α -esterase of mammalian sera
Biochem.J. 53, 117-124 (1953)
- (3) AUGUSTINSSON, K.-B. and HEIMBÜRGER, G.:
Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds
IV. Specificity studies
Acta chem. scand. 8, 753, 762, 915, 1533 (1954)
- (4) AUGUSTINSSON, K.-B. and HEIMBÜRGER, G.:
Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds
V. Effekt of phosphorylphosphatase on the inactivation of
cholinesterases by organophosphorus compounds in vitro
Acta chem. scand. 9, 310, 383 (1955)
- (5) BERGMAYER, H.U.:
Grundlagen der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie Weinheim, New York (1977)
- (6) Bienenschutzverordnung:
Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
Braunschweig (1972)

- (7) BUDECKE, E.:
Grundriß der Biochemie
De Gruyter-Verlag, 5. Auflage (1977)
- (8) DAUNDERER, M., WEGER, N.:
Vergiftungen - Erste Hilfemaßnahmen des behandelnden Arztes
Klinik Taschenbücher, Springer Verlag, Heidelberg (1978)
- (9) ERDÖS, E.G., BOGGS, L.E.:
Hydrolysis of paraoxon in mammalian blood
Nature (Lond.) 190, 716 (1961)
- (10) FRIEDBERG, K.D., ERDMANN, W.D.:
Spontane Reaktivierung der durch Alkylphosphate (Paraoxon, Systox, Isosystox) blockierten Cholinesterase in vitro
Arch. exp. Path. Pharmacol. 237, 1 (1959)
- (11) GELDMACHER- von MALLINCKRODT, M., LINDORF, H.:
Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serumcholinesterasen mit Alkylphosphaten
Vortrag auf der 48. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin in Berlin (1969)
- (12) GELDMACHER- von MALLINCKRODT, M., LINDORF, H., RABAST, U.:
Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serumcholinesterasen mit E 600
Arch. Toxikol. 25, 223 (1969)
- (13) GELDMACHER- von MALLINCKRODT, M., BAUMGARTNER, W., PETENYI, M., BURGIST, H., LINDORF, H., METZNER, H.:
Korrelation der unterschiedlichen Vergiftbarkeit der Serumcholinesterase durch E 600 und der Aktivität des E 600-spaltenden Enzym-Systems in menschlichen Seren
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 353, 217 (1972)

- (14) GELDMACHER- von MALLINCKRODT, M., LINDORF, H., PETENYI, M.,
FLÜGEL, M., FISCHER, T., HILLER, T.:
Genetisch determinierter Polymorphismus der menschlichen
Serum-Paraoxonase
Humangenetik 17, 331 (1973)
- (15) GELDMACHER- von MALLINCKRODT, M., PETENYI, M., FLÜGEL, M.,
BURGIS, H., METZNER, H.:
Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonase
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 354, 337-340 (1973)
- (16) GROB, D., LILIENTHAL, J.L., HARVEY, J.R., JONES, B.F.:
Administration of di-isopropylfluorophosphate (DFP) to man
Effect on plasma and erythrocyte cholinesterase, general
systemic effects; use in study of hepatic function and
erythropoiesis; and some properties of plasma cholinesterase
Bull. Johns Hopkins Hosp. 81, 217-244 (1947)
- (17) JAWETZ, E., GOLDFIN, A.:
Lehrbuch der Pharmakologie
Springer-Verlag (1976)
- (18) KEIDEL, W.D.:
Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie
Thieme-Verlag Stuttgart (1975)
- (19) KIMMERLE, G. und LORKE, D.:
Die Toxikologie der insektiziden Phosphorsäureester
Pflanzenschutznachrichten
Bayer, 21, 111-142 (1968)
- (20) KRISCH, K.:
Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitro-phenyl-phosphat
(E 600) durch menschliches Serum
Z.Klin.Chem.u.Klin.Biochem. 6, 41 (1968)

- (21) MAIN, A.R.:
The purification of the enzyme hydrolysing
di-ethyl-p-nitrophenyl phosphate (paraoxon)
in sheep serum
Biochem. J. 74, 10 (1960)
- (22) MOESCHLIN, S.:
Klinik und Therapie der Vergiftungen
Thieme-Verlag Stuttgart, 6. Auflage, (1980)
- (23) MOUNTER, L.A. and WITTAKER, V.P.:
The hydrolysis of esters of phenol by cholinesterases
Biochem.J. 54, 551 (1953)
- (24) NAKATSUGAWA, T., DAHM, P.A.:
Microsomal metabolism of parathion
Biochem. Pharmacol. 10, 391 (1967)
- (25) NEAL, R.A.:
Studies on the metabolism of diethyl-4-nitrophenyl-
phosphorothionate (Parathion) in vitro
Biochem. J. 103, 183 (1967)
- (26) NENNER, N.:
Phosphorylation of acetylcholinesterase in bovine blood by
paraoxon and soman
Arch.Toxikol. 30, (1973)
- (27) ROHEN, J.W.:
Funktionelle Anatomie des Menschen
Schattauer Verlag Stuttgart-New York
3. Auflage, (1975)

- (28) SCHAUMANN, W., SCHILLER, M.:
Inaktivierung von Alkylphosphaten im Gehirn und im Serum
Arch. exptl. Pathol. Pharmacol. 238, 114 (1960)
- (29) SCHRADER, G.:
Die Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäureester
Verlag Chemie GmbH, Weinheim (1963)
- (30) SKRINJARIC-SPOLJAR, M., REINER, E.:
Hydrolysis of diethyl-p-nitrophenylphosphate
and ethyl-p-nitro phenylethylphosphate by human sera
Biochem.Biophys. Acta 165, 289 (1968)
- (31) SÖ ESEN, S.P.L.:
Über die Messung und Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration
bei enzymatischen Prozessen
Biochem. Z. 21, 131 (1909)
- (32) WELFHÖNER, H.H.:
Allgemeine und systemische Pharmakologie und Toxikologie
Springer-Verlag Heidelberg-Berlin, 2. Auflage (1976)
- (33) Wissenschaftliche Tabellen Geigy:
Ciba Geigy Basel, 7. Auflage (1979)
- (34) WHO/FAO:
Evaluation of the toxicity of pesticide residues
in food. 153-160 (1965)
- (35) WHO/FAO:
Evaluation of some pesticide residues in food
Nome 1968

- (36) WIRTH, W., HECHT, G., GLOXHUBER, Ch.:
Toxikologie-Fibel für Ärzte, Apotheker,
Naturwissenschaftler, Juristen und Studierende
Thieme-Verlag Stuttgart, (1967)
- (37) ZÜRCHER, K.:
Über die enzymatische Hydrolyse von Organophosphaten
Inaugural-Dissertation, Göttingen (1971)

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. H.-B. Wuermeling für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut und für die freundliche Übernahme des Korreferats meinen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Dr. M. Geldmacher- von Mallinckrodt für die Überlassung dieses Themas, für ihre überaus große Hilfsbereitschaft und den zu jeder Zeit freundlich erteilten Rat.

Für die gute Betreuung während der praktischen Durchführung des Versuchs möchte ich mich bei Herrn Diplomchemiker P. Enders bedanken, ebenso beim Direktor des Erlanger Schlachthofes, Herrn Dr. Schmenger, für die Beschaffung der Tierseren.

L e b e n s l a u f

=====

Geboren: 21. März 1957 in Rom/Italien

Eltern: Hörl, Willi, stellvertretender Anstalts-
leiter am Gymnasium in Pegnitz
Hörl, Marianne, geb. Funke

Geschwister: Hörl, Joachim
Hörl, Monika

Schulen: 1963 - 1967: Evangelische Gemeinschafts-
schule in Pegnitz
1967 - 1976: Wilhelm von Humboldt-Gymnasium
in Pegnitz

Studium: Seit 1976: Humanmedizin an der Friedrich-
Alexander-Universität Erlangen-
Nürnberg; Beginn im WS 1976
Ärztliche Vorprüfung: August 1978
1. Ärztliche Prüfung: August 1979
2. Ärztliche Prüfung: April 1982
3. Ärztliche Prüfung: April 1983
Approbation: 15. Juni 1983

